

Bruk av miljø-DNA for deteksjon av arter

Av Annette Taugbøl, Frode Fossøy og Børre Dervo

Annette Taugbøl, Frode Fossøy og Børre Dervo er forskere ved Norsk institutt for naturforskning.

Summary

Applying environmental DNA to detect species.

The traditional ways to detect species can often be a challenge, as certain species can be hard to catch at certain times of the year, or the population can be so small that the likelihood of catchment is minute. Examination of many localities are also very time demanding, and can yield false negative results, especially if the probability of catchment is low. It is therefore a need to improve the traditional ways of fieldwork with new methods to gain more reliable results, as well as reducing the cost in order to increase the number of study localities to further improve the knowledge on species boundaries. The objective of this paper is the use of environmental DNA (eDNA) collected from water and the potential this easy sampling method has to detect species. By only filtering 0.5-liter water from a pond, we could detect great crested newts (*Triturus cristatus*) in all 12 localities included in this study. Also, there are no known breeding population in one of the ponds included in this study, but by using eDNA we were able to detect traces of the few individuals that are likely using the pond on their way to the breeding grounds. This illustrates that the use of eDNA is a very promising method to detect species in the wild.

Sammendrag

Tradisjonell overvåkning av storsalamandere kan ofte være utfordrende da dyrene kan ha lav fangbarhet ved f.eks. lav temperatur og etter for-

plantning. Overvåkning av mange lokaliteter er svært tidkrevende, og i perioder med lav fangbarhet kan det også gi falske negative resultater. Det har derfor vært ønskelig å teste ut nye metoder som kan brukes, både i forbindelse med overvåking og for å kartlegge nye dammer. Filtrering av miljø-DNA er en forholdsvis ny metode for å påvise arter fra ulike miljøer. I dette studiet ble det filtrert vannprøver fra totalt 12 dammer, der resultatene indikerer at dette er en svært lovende metode for å enkelt kunne påvise tilstedeværelse eller fravær for ønsket art. Dette studiet bruker storsalamander som eksempel, men metodene kan enkelt overføres til andre arter av interesse.

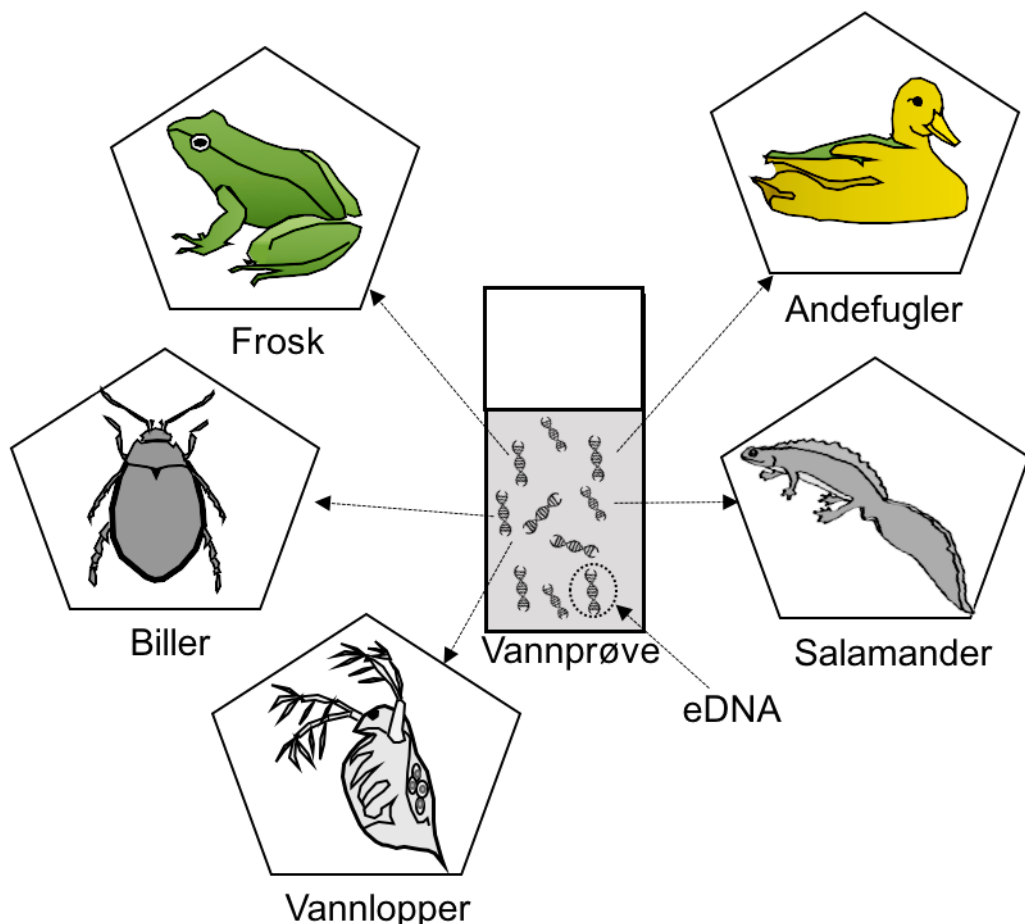
Introduksjon

Tilstedeværelse av en art kan måles på ulike måter, som bestandsstørrelse, forekomstareal og utbredelsesområde, men det å faktisk kunne dokumentere tilstedeværelse av arter kan ofte være krevende, både med tanke på innsats, tid og økonomi. Dette gjelder også for vannlevende dyr, der estimater og påvisning av dyr kan avvike fra faktiske forhold på grunn av lav fangbarhet eller sesongbetonte variasjoner i adferd. Samtidig er det viktig å inneha informasjon om arters utbredelse, slik at man bedre kan forstå artenes økologiske krav, deres sårbarhet for endringer i naturen og om utbredelsen endres over tid.

Per i dag gjennomføres det meste av bestandsvurderinger i vannholdig miljø med tradisjonelle metoder som fangstdata, garnfiske, rusefangst og diverse sedimentprøver der man fysisk sepa-

rerer artene fra hverandre ved hjelp av f.eks. lupe. Dette er med andre ord tidkrevende og kostbart arbeid som også ofte krever faglig kompetanse på lab og i felt. Miljø-DNA er alt DNA isolert fra jord, vann og luft, og er derfor en kompleks blanding av DNA-fragmenter fra ulike organismer i det gitte miljøet (både fra mitokondriet og cellekjernen, intra- og extracellulært) (Diaz-Ferguson & Moyer, 2014), se Figur 1 for illustrasjon. Miljø-DNA representerer derfor ideelt sett alle arter i et gitt økosystem, der det isolerte DNAet kan avleses med arts-spesifikke genetiske markører og slik si noe om tilstedeværelse eller fravær for artene det ønskes informasjon om.

Storsalamanderen (*Triturus cristatus*) har en delt livshistoriestrategi, da den veksler mellom et liv i vann om våren og et liv på land fra sensommeren (Dervo et al., 2003) og vandringsmønsteret er veldig preget av temperatur og nedbør (Dervo et al., 2016a). Det brukes per i dag ulike metoder for å overvåke storsalamanderpopulasjoner, blant annet bunnhåv, flaskefelle, ortmannsfeller og fiskeruser, i tillegg til direkte observasjon av dyr på vandring eller i vannoverflaten (Dervo et al., 2003). Fordelene med disse metodene er at man ved å faktisk fange dyrene kan si noe om kjønnsfordelinger og generell tilstand for individene, men krever også noe ekspertise i felt, samt at en også trenger noe



Figur 1: Miljø-DNA i en vannprøve. Ved å samle inn f.eks. vann fra en dam kan man også få informasjon om hva slags arter som lever i eller har besøkt dammen. I dette studiet ble det kun testet for deteksjon av storsalamander, men ved bruk av flere primerpar som identifiserer andre arter, eller f.eks. sekvensering, kan en få informasjon om flere arter.

kunnskap om livshistorie til de faktiske populasjonene for å vite hvilken fangstmetode som bør benyttes for å sikre god kvalitet på de innsamlede dataene (Dervo et al., 2003). Rusefangst egner seg dårlig etter gyting og ved kaldt vann selv om dyrene er i dammen, mens bunnhåv egner seg best for å fange inn larver. Metodene kan også være vanskelig å standardisere mellom lokaliteter og brukere. Målet med dette studiet var derfor å teste ut om miljø-DNA kan være en egnet metode for påvisning av storsalamander i dam. Det ble samlet inn vann fra 12 dammer spredt over Lier kommune i Buskerud, vannet ble filtrert og ekstrahert for DNA før storsalamander kunne påvises via artsspesifikke primere i en Polymerase Chain Reaction (PCR).

Materialer og metoder

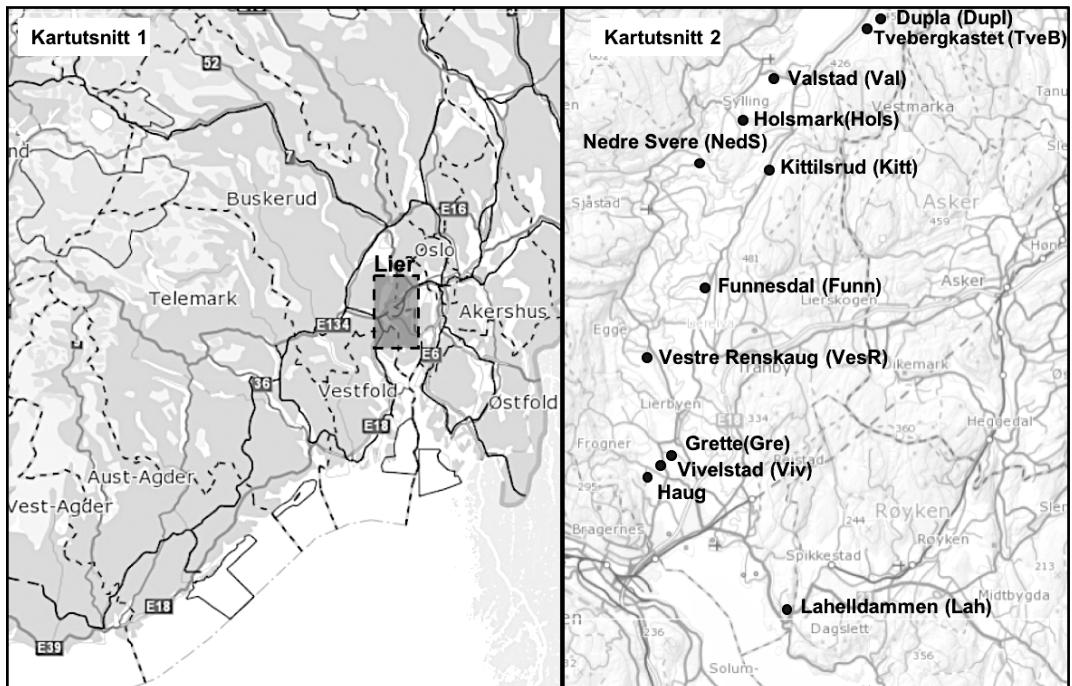
Utvelgelse av dammer

Av totalt 21 dammer i Lier kommune i Buskerud som har vært under årlig overvåkning med rusefangst ble det valgt ut 12 dammer, se Figur 2 for kart over Lier og innsamlingsdammene. Av de 12 dammene har det vært jevn, god fangst i

ni av dammene, mens en av dammene (Dupla) trolig ikke har egne reproduserende populasjoner av storsalamander, men fungerer som mellomstasjoner for adulte dyr etter gyting, da det ikke har vært påvist yngling av storsalamander i dammene (B.K. Dervo, upubliserte resultater).

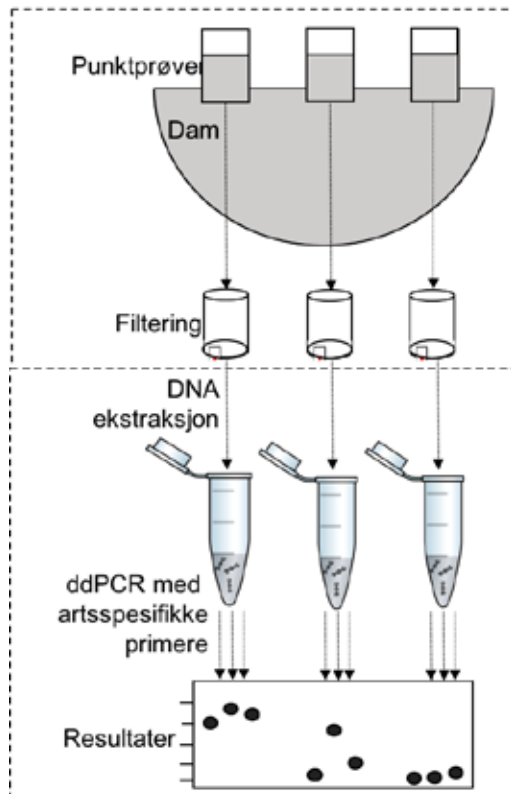
Vannprøver:

Det ble tatt tre punktprøver av totalt 12 dammer i mai 2016. I ti av lokalitetene ble det også gjennomført tradisjonell rusefangst samtidig med at vannprøvene ble tatt, og vannprøvene ble da tatt i det samme området som rusene ble satt både før og etter at rusene hadde stått ute i ca. 24 timer. Vannprøvene på 0.5 liter ble tatt innenfor samme fangstområde som rusene ble satt i/hadde stått i, og vannet ble filtrert gjennom et finmasket filter (Naglene analytical test filter funnels, 0,45 µl, ThermoFisher Scientific) ved hjelp av en håndholdt pumpedrill. Filteret ble puttet direkte i en pose med silicakuler som tørker ut og bevarer DNAet i prøven, der det ble liggende frem til DNA ekstraksjon. Det ble også tatt med to kontrollprøver på 0.5 liter fra offentlig vann-nett



Figur 2: Kart over innsamlingsdammene. Kartutsnitt 1 illustrerer Sør Norge der Lier kommune i Buskerud er avmerket, og kartutsnitt 2 viser hvor de ulike dammene er lokalisert, merket med navn og forkortelser.

som ble filtrert med det samme utstyret som damvannet. Materialer og metoder er oppsummert i Figur 3.



Figur 3: **Oversikt over metodene brukt i dette studiet.** Det ble først samlet inn vannprøver som tre punktprøver per lokalitet som ble filtrert gjennom et filter med små nok porestørrelser (oppgi porestørrelse) for å fange opp DNAet i vannet. Filteret ble sendt inn til DNA isolering før det totale DNAet i hver punktprøve ble kjørt i tre replikater av ddPCR med kjente artsspesifikke markører. Ved å lese av antall positive dråper av totalt antall dråper som ble generert, kan man så beregne konsentrasjon av målorganismens DNA i punktprøven. Se mer informasjon under materialer og metoder.

DNA ekstraksjon og ddPCR

DNAet oppsamlet i filtrerne ble isolert ved hjelp av DNA Blood and Tissue kit (Qiagen). For å detektere storsalamander ble det kjørt Digital droplet PCR (ddPCR) (Hindson et al., 2011) på artsspesifikke primere som kun amplifiserer DNA fra storsalamander og ingen andre arter.

Tabell 1: Viser lokalitetsnavn (Lokalitet) som indikert på Figur 2, vannprøve (VannPr) 1-3 i, gjennomsnittlig DNA konsentrasjon av de tre PCRene som ble kjørt per vannprøve (Gj.Sn[DNA]), standardfeil (SE) og standardiserte tall for rusefangst (RuseF). Se materialer og metoder og Figur 3 for mer informasjon.

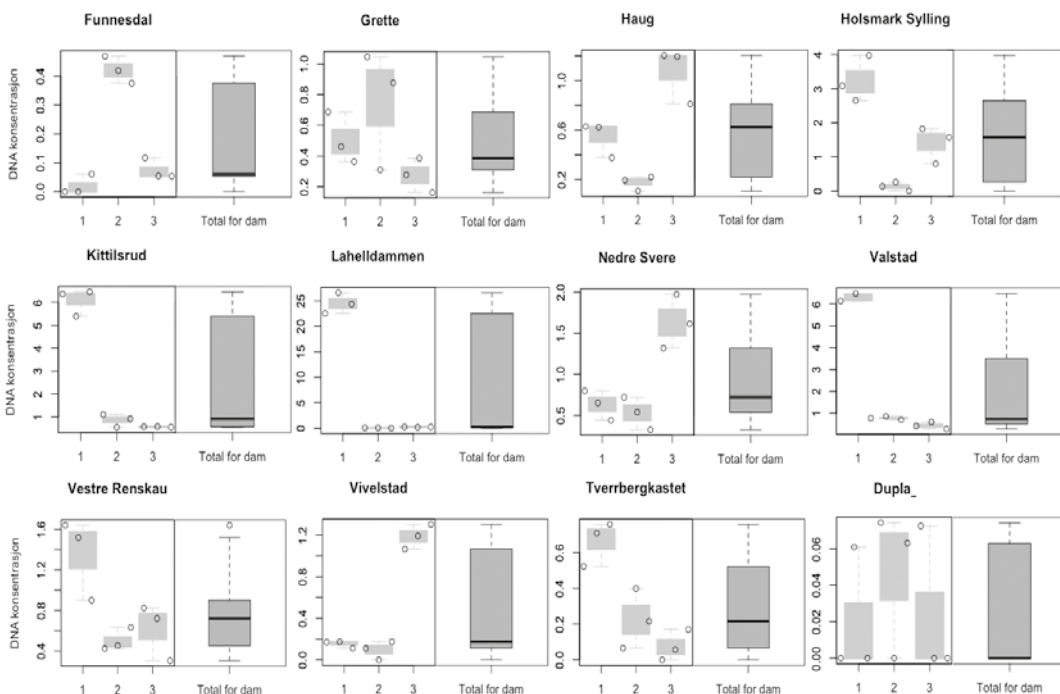
Lokalitet	VannPr.	Gj.Sn [DNA]	SE	RuseF
Dupl	1	0,020	0,020	0
	2	0,045	0,023	
	3	0,024	0,024	
Funn	1	0,020	0,020	0,025
	2	0,420	0,027	
	3	0,074	0,021	
Gre	1	0,504	0,096	0,011
	2	0,744	0,130	
	3	0,275	0,064	
Haug	1	0,543	0,083	0,028
	2	0,175	0,034	
	3	1,071	0,129	
Hols	1	3,243	0,390	0,32
	2	0,130	0,074	
	3	1,398	0,307	
Kitt	1	6,07	0,341	0,165
	2	0,86	0,165	
	3	0,57	0,007	
Lah	1	24,48	1,727	0,088
	2	0,038	0,019	
	3	0,21	0,022	
NedS	1	0,629	0,104	0,121
	2	0,530	0,113	
	3	1,635	0,190	
TveB	1	0,662	0,071	0
	2	0,227	0,096	
	3	0,076	0,050	
Val	1	6,306	0,174	0,04
	2	0,774	0,047	
	3	0,428	0,091	
VesR	1	1,353	0,230	0,706
	2	0,502	0,065	
	3	0,615	0,159	
Viv	1	0,153	0,019	0,091
	2	0,096	0,051	
	3	1,187	0,068	

ddPCR er en PCR metode som gir en absolutt måling av DNA molekyler i prøven (Hindson et al., 2011). Dette skjer ved at prøven under kjøring deles opp i inntil 20 000 små oljedråper, der det i hver oljedråpe foregår en PCR-reaksjon. Hver av dråpene blir så avlest som et positivt eller et negativt resultat, avhengig om dråpen inneholder DNA fra organismen man tester for eller ikke. Ved å korrelere for filtrert vannvolum og diverse forfynninger av prøven i lab gir resultatene en standard verdi for DNA-mengde i originalprøven (Fossøy et al., 2017).

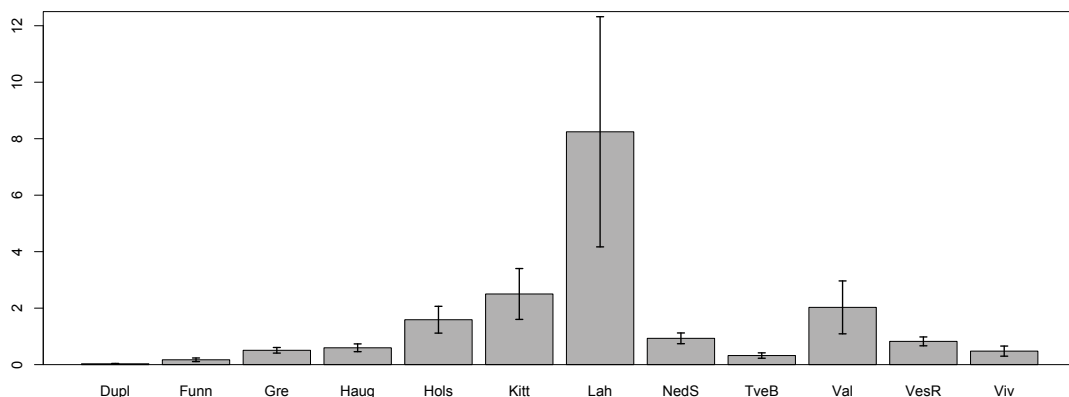
Resultater

Det ble påvist DNA fra storsalamander i samtlige 10 dammer med stabile populasjoner, og i to dammer der det har vært få eller ingen observasjoner i senere tid, se Figur 4 og 5, og Tabell 1. At Dupla og Tvebergkastet hadde lave konsentra-

sjoner av storsalamander er som forventet og indikerer også at de artsspesifikke markørene ikke amplifiserer andre typiske dam-arter. De to kontrollene gav også som forventet ikke utslag på storsalamander, en sterk indikasjon på at utstyret ikke er forurenset med storsalamander-DNA, se tabell 1. Det var forholdsvis store variasjoner mellom de tre punktprøvene tatt for samme dam, spesielt Kittilsrud, Lahelldammen og Valstad hadde høy variasjon, se Figur 5 og Tabell 1. Lahelldammen hadde spesiell høy standardfeil, da en av punktprøvene hadde en gjennomsnittskonsentrasjon på 24.5 mens de to andre hadde henholdsvis 0.04 og 0.20. Gjennomsnittlig miljø-DNA konsentrasjon for alle tre punktprøver er plottet i figur 5, sammen med standardfeil og standardisert rusefangst (antall fangede dyr justert for antall rusetimer).



Figur 4: **Boksplot.** Resultatene for de 12 ulike dammene, der Tvebergkastet og Dupla er dammer uten påviste dyr i rusefangst. Det første plottet per dam viser først de tre punktprøvene fra dammen representert som 1, 2 og 3 på x-aksen, der hver punktprøve er kjørt i tre replikate PCRer og resultatet for hver er vist som en sirkel opp mot y-aksen. Total variasjon for hver punktprøve over de tre PCRene er oppsummert som et grått boksplott. Total variasjon for alle ni PCR-reaksjoner per dam er oppsummert i det andre plottet, merket total for dam. Resultater for kontrollprøvene tatt fra offentlig vannverk er ikke illustrert da de var negative (DNA konsentrasjon for storsalamander var null).



Figur 5: Figuren viser gjennomsnitt og standardfeil (SE) av miljø-DNA konsentrasjonen for de 12 ulike dammen, samt gjennomsnittlig standardisert rusefangst (det ble ikke fanget med ruser i Dupla og Tvebergskampen), markert med røde sirkler. Se tabell 1 for nøyaktige tall.

Diskusjon

Ved å kun samle inn og filtrere tre halvliter med vann per lokalitet ble det påvist tilstedeværelse av storsalamander i samtlige 12 dammer. At det ble påvist storsalamander i Dupla, dammen der det per i dag ikke foregår rekrutering av storsalamander, men der ett og annet individ til tider oppholder seg, viser at miljø-DNA er en egnet metode for påvisning av arter, også der det er lav konsentrasjon av individer. Dette kan være spesielt viktig for sårbare arter som storsalamanderen (Dervo et al., 2016b), da mange små populasjoner kan registreres som tapte og det da heller ikke vil settes inn tiltak for å forbedre situasjonen.

At miljø-DNA er en sensitiv metode for påvisning av arter er også vist i tidligere studier av amfibier. I Frankrike ble miljø-DNA brukt sammen med tradisjonelle metoder for å kartlegge Amerikansk oksefrosk (*Lithobates catesbeianus*) (Dejean et al., 2012). Av de 49 lokalitetene de hadde med i studiet, ble det detektert oksefrosk på tradisjonelt vis i 7 av dammene, mens man med miljø-DNA detekterte froskearten i hele 38 lokaliteter (Dejean et al., 2012). Det er også brukt miljø-DNA for kartlegging av salamander i hele Storbritannia, og siden metoden ikke trenger å bruke fagpersoner i felt er det også hentet inn verdifulle data ved hjelp av frivillige vannprøvetakere (Biggs et al., 2015).

Miljø-DNA har også potensiale til å oppdage spredning av fremmede arter tidlig i spredningsforløpet (Smart et al., 2015; Borrell et al., 2017), samt gi kostnadseffektive resultater (Smart et al., 2016) for større områder på kortere tid, noe som kan være spesielt viktig i områder med kort sesong, slik som Norge.

Analysemetoden brukt i dette studiet sier også noe om mengde storsalamander-DNA fra de ulike dammene, men det er stor variasjon mellom punktprøvene. Mengde DNA er i praksis avhengig av kroppsstørrelse, aktivitetsnivå, habitatvalg og temperatur/sesong på innsamlingstidspunktet, og kan derfor gi svært variable resultater (Sassoubre et al., 2016; Dejean et al., 2011). At variasjonen er så stor som i Lahell-dammen skyldes trolig filtrering av opphopninger av vevsmateriale, celleklumper eller skinnrester, eller at punktprøven har blitt tatt i nærheten av en oppsamling av dyr. Hvis miljø-DNA også skal brukes til å beregne størrelser på bestander er det derfor viktig å innhente vannprøver som best mulig homogeniserer inntrykket på tvers av lokaliteten, eller eventuelt for-filtrere vannet for å trekke ut de største celleklumpene. Selv om populasjonsstørrelsen i Lahell-dammen er stor, er det også en stor dam med lavere tetthet av dyr, slik at forventningene til mengde miljø-DNA i prøvene også er lavere.

Dette er også antydnet av to av vannprøvene fra Lahelldammen og viser verdien av replikate prøver.

Dette studiet viser derfor at miljø-DNA representerer en velegnet metode for deteksjon av arter innen et gitt miljø, der det isolerte DNAet avleses med genetiske markører og slik sier noe om tilstedeværelse eller fravær for artene det ønskes informasjon om. Totalt sett trengs det mer arbeid for å lage gode innsamlingsmetoder for vann før man kan kvantifisere bestandsstørrelser av dyr fra miljø-DNA, men som deteksjon er miljø-DNA en velegnet metode som bør benyttes mer i artskartlegningsprosjekter.

Referanser

- Biggs, J., Ewald, N., Valentini, A., Gaboriaud, C., Dejean, T., Griffiths, R. A., Foster, J., Wilkinson, J. W., Arnell, A., Brotherton, P., Williams, P. & Dunn, F. 2015. Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Biological Conservation* **183**: 19-28.
- Borrell, Y. J., Miralles, L., Do Huu, H., Mohammed-Geba, K. & Garcia-Vazquez, E. 2017. DNA in a bottle—Rapid metabarcoding survey for early alerts of invasive species in ports. *PLOS ONE* **12**: e0183347.
- Dejean, T., Valentini, A., Duparc, A., Pellier-Cuit, S., Pompanon, F., Taberlet, P. & Miaud, C. 2011. Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems. *PLoS ONE* **6**.
- Dejean, T., Valentini, A., Miquel, C., Taberlet, P., Bellemain, E. & Miaud, C. 2012. Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Journal of Applied Ecology* **49**: 953-959.
- Dervo, B. K., Bærum, K. M., Skurdal, J. & Museth, J. 2016a. Effects of temperature and precipitation on breeding migrations of amphibian species in southeastern Norway. *Scientifica*.
- Dervo, B. K., Pedersen, C. & KM, B. 2016b. Tap av ynglelokaliteter for storsalamander i Norge. *NINA Rapport* **1014**.
- Dervo, B. K., Skei, J. K., Van der Kooij, J. & Skurdal, J. 2003. Bestands situasjon og opplegg for overvåking av storsalamander (*Triturus cristatus*) i Norge. *Vann* **4**.
- Diaz-Ferguson, E. E. & Moyer, G. R. 2014. History, applications, methodological issues and perspectives for the use of environmental DNA (eDNA) in marine and freshwater environments. *Revista De Biologia Tropical* **62**: 1273-1284.
- Fossøy, F., Dahle, S., Eriksen, L. B., Spets, M. H., Karlsson, S. & Hesthagen, T. (2017) Bruk av miljø-DNA for overvåking av fremmede fiskearter. Utvikling av artsspesifikke markører for gjedde, mort og ørekyt. In: *NINA Rapport*. pp. 33 pages. Norsk Institutt for Naturforskning.
- Hindson, B. J., Ness, K. D., Masquelier, D. A., Belgrader, P., Heredia, N. J., Makarewicz, A. J., Bright, I. J., Lucero, M. Y., Hiddessen, A. L., Legler, T. C., Kitano, T. K., Hodel, M. R., Petersen, J. F., Wyatt, P. W., Steenblock, E. R., Shah, P. H., Bousse, L. J., Troup, C. B., Mellen, J. C., Wittmann, D. K., Erndt, N. G., Cauley, T. H., Koehler, R. T., So, A. P., Dube, S., Rose, K. A., Montesclaros, L., Wang, S., Stumbo, D. P., Hodges, S. P., Romine, S., Milanovich, F. P., White, H. E., Regan, J. F., Karlin-Neumann, G. A., Hindson, C. M., Saxonov, S. & Colston, B. W. 2011. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical Chemistry* **83**: 8604-8610.
- Sassoubre, L. M., Yamahara, K. M., Gardner, L. D., Block, B. A. & Boehm, A. B. 2016. Quantification of Environmental DNA (eDNA) Shedding and Decay Rates for Three Marine Fish. *Environmental Science & Technology* **50**: 10456-10464.
- Smart, A. S., Tingley, R., Weeks, A. R., van Rooyen, A. R. & McCarthy, M. A. 2015. Environmental DNA sampling is more sensitive than a traditional survey technique for detecting an aquatic invader. *Ecological Applications* **25**: 1944-1952.
- Smart, A. S., Weeks, A. R., van Rooyen, A. R., Moore, A., McCarthy, M. A. & Tingley, R. 2016. Assessing the cost-efficiency of environmental DNA sampling. *Methods in Ecology and Evolution* **7**: 1291-1298.